

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Mario Špoljarić

**Periferni i centralni učinci botulinum toksina tipa
A kod imunogene upale koljena štakora izazvane
Freundovim adjuvansom**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom dr. sc. Ivica Mataka i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2018./2019.

Mentor rada: dr.sc. Ivica Matak

Popis i objašnjenje kratica korištenih u ovome radu:

ACh - acetilkolin

ATP – adenzin trifosfat

BoNT/A - botulinum toksin tipa A

CD4+ T-limfociti - podvrsta T–limfocita koji na svojim membranama imaju imunohistokemijski biljeg CD4+

CFA - kompletni Freundov adjuvans

c-Fos - stanični FBJ osteogeni sarkom protein (cellular FBJ murine osteogenic sarcoma protein)

CGRP - peptid povezan s genom kalcitonina (calcitonin gene-related peptide)

FDA - Američka agencija za hranu i lijekove (Food and Drug Administration)

IFN- γ - interferon gama

LD50 - medijan letalne doze, doza koja bi usmrtila 50% izloženih subjekata

PAM - mjerenje uporabe pritiska (Pressure application measurement)

PGE2 - prostaglandin E2

PGI2 - prostaglandin I2 (prostaciklin)

pH - negativni logaritam koncentracije vodikovih iona (mjera kiselosti)

SNAP 25 - protein povezan sa sinaptosomom molekulske mase 25 kilodaltona (synaptosomal-associated protein 25)

SNARE - receptor koji veže topivi faktor osjetljiv na N-etilmaleimid (eng. Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)

TNF- β - čimbenik tumorske nekroze beta (tumor necrosis factor beta)

TRPV1 - vaniloidni receptori – kanali prolaznog potencijala 1 (transient receptor potential cation channels - vanilloid, type 1)

Sadržaj

1 Uvod	1
1.1 Botulinum neurotoksin	1
1.1.1 Clostridium botulinum i botulizam.....	2
1.1.2 Uporaba botulinum toksina u terapijske svrhe kroz povijest.....	2
1.1.3 Terapijski oblici BoNT/A	3
1.1.4 Doze BoNT/A	4
1.1.5 Kontraindikacije i nuspojave BoNT/A	4
1.2 Analgetski učinci botulinum toksina	5
1.3 Upala	7
1.3.1 Neurogena upala.....	7
1.3.2 Imunogena upala.....	8
1.4 Djeluje li BoNT/A periferno i/ili centralno?	8
2 Hipoteza	10
3 Ciljevi rada	10
4 Materijali i metode	11
4.1 Eksperimentalne životinje	11
4.2 Ispitane tvari i tvari korištene za indukciju upale	11
4.2.1 Botulinum toksin tipa A	11
4.2.2 Kompletni Freundov adjuvans	11
4.3 Eksperimentalni postupci.....	12
4.3.1. Primjena botulinum toksina i CFA u koljeno.....	12

4.3.2 Primjena botulinum toksina u intratekalni lumbarni prostor	13
4.4 Eksperimentalne metode korištene u kvantificiranju izazvane upale i boli	13
4.4.1 Određivanje edema mjerenjem promjera upaljenoga zgloba	13
4.4.2 Određivanje propusnosti krvnih žila za proteine plazme mjerenjem tkivne ekstravazacije plazmatskih bjelančevina u kompleksu s Evans Blue bojom	13
4.4.3 Mjerenje bolnih podražaja metodom PAM	15
4.5 Eksperimentalni dizajn	16
4.5.1 Skupine životinje	16
4.6 Statistička obrada rezultata istraživanja	17
5 Rezultati	19
5.1 CFA	19
5.2 Učinci botulinum toksina na upalne parametre	20
5.2.1 Edem	20
5.2.2 Ekstravazacija plazmatskih bjelančevina	21
5.3 Učinak BoNT/A na nocicepciju	22
6 Rasprava	24
6.1 Izazivanje akutne imunogene upale pomoću CFA	24
6.2 BoNT/A smanjuje mjerene parametre upale	24
6.3 Učinak na smanjenje boli nije opažen	25
6.4 Usporedba perifernih i središnjih učinaka BoNT/A na upalu	25
7 Zahvale	28
8 Bibliografija	29
9 Životopis	37

Sažetak

Autor: Mario Špoljarić

Naslov: Periferni i centralni učinci botulinum toksina tipa A kod imunogene upale koljena štakora izazvane Freundovim adjuvansom

Uvod i cilj. Botulinum neurotoksin tip A (BoNT/A) selektivno ulazi u neurone i inhibira egzocitozu neurotransmitera u sinaptičku pukotinu proteolitičkim cijepanjem sinaptosomalnog proteina od 25 kilodaltona (kDa). Cilj ovoga pokusa bio je istražiti periferne i središnje protuupalne i antinociceptivne učinke BoNT/A kod upale koljena štakora izazvane kompletnim Freundovim adjuvansom (CFA).

Materijali i metode BoNT/A je apliciran intratekalno (i.t.) na razini lumbalne kralježnice (2 U/kg/10µl), ili intraartikularno (i.a.) u koljeno (7 U/kg/20µl). Nakon 7 dana, izazvana je upala koljena injekcijom CFA (50 µl). Za evaluaciju edema životinjama je mjeren promjer koljena, a nociceptivni bihevioralni odgovor pomoću uređaja za mjerenje primijenjenog pritiska (engl. Pressure Application Measurement-PAM), prije i poslije tretmana s CFA. Dva dana nakon indukcije upale, učinak na ekstravazaciju proteina plazme je određen spektrofotometrijski mjerenjem sadržaja kompleksa Evans blue i proteina plazme u uklonjenom tkivu zgloba.

Rezultati. BoNT/A injiciran direktno u zglob (i.a.) je smanjio promjer natečenog zgloba s maksimalnim učinkom dva dana nakon početka upale, dok BoNT/A primijenjen i.t. nije smanjio edem. S druge strane, učinak na smanjenje ekstravazacije je bio statistički značajan samo u skupini kojoj je BoNT/A primijenjen u lumbalni intratekalni prostor.

Zaključak. Botulinum toksin smanjuje oteklinu zgloba samo nakon periferne primjene, a ekstravazaciju proteina nakon središnje primjene. Uzrok tome bi moglo biti djelovanje na različite medijatore imunogene upale ovisno o mjestu primjene, a za otkrivanje molekularne podloge različitog učinka na pojedine komponente upale potrebna su daljnja istraživanja.

Ključne riječi: botulinum toksin tipa A, upala, kompletni Freundov adjuvant, edem, ekstravazacija

Summary

Author: Mario Špoljarić

Title: Peripheral and central effects of botulinum toxin type A in Freund adjuvant induced immunogenic inflammation in rat knee

Introduction and aim. Botulinum neurotoxin type A (BoNT/A) selectively enters neurons and inhibits synaptic neurotransmitter exocytosis by proteolytic cleavage of synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25). The aim of this experiment was to evaluate peripheral and central anti-inflammatory and antinociceptive effects of BoNT/A in rats with complete Freund's adjuvant (CFA)- induced knee joint inflammation.

Materials and methods. Botulinum toxin was administered intrathecally (i.t.) at the level of lumbar spine (2 U/kg/10µl), or intraarticularly (i.a.) into the rat knee (7 U/kg/20µl). After 7 days, to induce inflammation, animals were injected with CFA (50 µl). The knee diameter was measured for evaluation of edema, while nociceptive behavioural response was assessed by employing the Pressure Application Measurement (PAM) device . The effect on plasma protein extravasation was evaluated using spectrophotometry by measuring the removed joint tissue content of Evans-blue-plasma protein complex , two days after induction of the inflammation.

Results. BoNT/A injected directly into the joint (i.a.) significantly reduced edema, with the peak effect on the second day of the inflammation. BoNT/A administered intrathecally didn't reduce edema. On the other hand, the significant reduction of plasma protein extravasation was observed only in BoNT/A i.t- injected animals.

Conclusion. In present experiments, BoNT/A reduces edema only when delivered in the peripheral nervous system, while it reduces plasma protein extravasation when administered into the CNS. Dependently on the toxin application site, differences in observed BoNT/A effects might be caused by different inflammatory mediators affected. Further experiments to determine the molecular mechanisms of BoNT/A anti-inflammatory action are needed.

Keywords: botulinum toxin, inflammation, complete Freund's adjuvant, edema, extravasation

1 Uvod

Botulinum toksin tipa A (BoNT/A) se smatra jednim od najsmrtonosnijih toksina poznatih u prirodi, budući da LD₅₀ (središnja ili medijana letalna doza) parenteralno unesenog toksina iznosi oko 1 ng/kg.(1) Intoksikacija botulinum neurotoksinom se primarno očituje kliničkom slikom mlohave paralize uzrokovane inhibicijom lučenja neurotransmitera acetilkolina u sinaptičku pukotinu između motornog neurona i mišićnog vlakna. Na taj način zaustavlja prijenos akcijskog potencijala na mišićnu stanicu, i, slijedom toga, onemogućuje pokret mišića. Smrt otrovanjem botulinum neurotoksinom obično nastupa zbog paralize dišnih mišića, prvenstveno dijafragme.

Botulinum toksin se koristi terapijski u liječenju boli. Podaci dobiveni randomiziranim kliničkim istraživanjima ukazuju na to da bi mogao djelovati na artritis u ljudi i životinja.(2–5) Smatra se da svoj učinak ostvaruje djelovanjem u perifernom živčanom sustavu, međutim, nedavna istraživanja iz našeg laboratorija su pokazala da djeluje na udaljenu neurogenu upalu u području moždanih ovojnica, ovisno o središnjem učinku.(6) Cilj ovog istraživanja je detaljnije istražiti moguće središnje djelovanje BoNT/A na upalu.

1.1 Botulinum neurotoksin

Postoji 7 serotipova Botulinum neurotoksina (A-G) koje sintetiziraju bakterije vrste *Clostridium botulinum*. Botulinum toksin se sastoji od teškoga lanca (100 kDa) koji posreduje prepoznavanje neuronskog završetka i ulazak u stanicu, te lakoga lanca (50 kDa) koji ulazi u citosol gdje djeluje kao metaloproteinaza ovisna o cinku specifično na proteine tzv. receptora koji veže topivi faktor osjetljiv na N-etilmaleimid (eng. Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor; SNARE). Posljedice toksičnog djelovanja i duljina oporavka ovise o serotipu te sinaptičkom proteinu kojeg cijepaju.(7) Svoj neuromuscularni učinak BoNT/A ostvaruje selektivnim ulaskom u završetke neurona te inhibicijom neuroegzocitoze proteolitičkim cijepanjem sinaptosomalnoga proteina molekulske mase od 25kDa (eng. synaptosomal-associated protein of 25 kDa; SNAP-25). SNAP-25 je odgovoran za vezanje i spajanje sinaptičkih mjehurića acetilkolina u presinaptičkom neuronu.(8)

1.1.1 Clostridium botulinum i botulizam

Clostridium botulinum je učestala anaerobna bakterija koja živi u tlu. Proizvodi endospore koje su vrlo otporne na nepovoljne uvjete. Nastupom povoljnih anaerobnih uvjeta spora prelazi u bacilni oblik koji proizvodi botulinum toksin. Botulizam nastaje intoksikacijom unesenom hranom koja sadrži već sintetizirani botulinum toksin. Na prostoru Republike Hrvatske botulizam rijetko nastupa nakon konzumacije konzervirane hrane zbog strogo kontroliranih uvjeta proizvodnje i uvoza. Češće su intoksikacije sušenim mesom i proizvodima domaće proizvodnje. Moguć je nastanak botulizma zaražavanjem rane sporama klostridija koje germiniraju u bacile. Ovaj način intoksikacije je predominantno prisutan kod intravenskih ovisnika o opijatima. Klinička slika intoksikacije botulinom toksinom obično nastupa 12-36 h nakon ingestije hrane, a očituje se sa simetričnom slabošću, brzim umaranjem i paralizom poprečno-prugastih mišića. Bolesnik je afebrilan, pri svijesti, očuvanog senzibiliteta. Osim inhibicije egzocitoze acetilkolina u neuromuskularnu spojnicu, botulinum toksin smanjuje izlučivanje acetilkolina u sinapse glatkih mišića, ali i izlučivanje u perifernim sinapsama i sinapsama ganglija parasimpatičkog živčanog sustava. Botulizam je stoga obilježen izrazitom suhoćom usta i ostalih sluznica, dilatacijom zjenica, opstipacijom, vrtoglavicom i glavoboljom. Liječenje botulizma se zasniva na specijalnoj i simptomatskoj terapiji. Specijalna terapija podrazumijeva poliklonska protutijela iz konjskoga seruma za serotipove A, B i E. Simptomatska terapija, često dugotrajna, uključuje intenzivnu skrb životno ugroženih bolesnika pri kljenuti mišića za gutanje i disanje. Disanje se osigurava traheotomijom, intubacijom i provođenjem mehaničke ventilacije, a prehrana putem nazogastrične sonde.(9)

1.1.2 Uporaba botulinum toksina u terapijske svrhe kroz povijest

Njemački pjesnik i liječnik Justinus Kerner (1786.-1862) prvi je detaljno i sistematično opisao kliničku sliku botulizma. Proučavajući učestalo obolijevanje u gradu Württembergu tijekom dvije godine u 76 oboljelih, prvi je shvatio da bolest nastaje konzumacijom dimljenih mesnih proizvoda.(10) U svojem daljnjem radu, Kerner je pokušao izolirati toksični spoj koji je uzrokovao kliničku sliku mlohavice paralize i smrt. Radeći eksperimente na životinjama, pa i na samome sebi, zaključio je da supstanca iz pokvarenih kobasica uzrokuje prekid perifernog i autonomnog

živčanog signala, bez utjecaja na provođenje osjeta. U posljednjem dijelu svoje knjige o proučavanoj bolesti, objavljenoj 1822. godine, Kerner je predstavio ideje o potencijalnom terapijskom učinku toksina iz zaraženog mesa iznoseći tvrdnju da bi, u vrlo malim dozama, toksin mogao imati povoljan učinak u stanjima hiperekscitabilnosti i hiperaktivnosti motornog i autonomnog živčanog sustava. Jednu od bolesti za koju je smatrao da uporaba toksina ima indikaciju jest Sydenhamova koreja, tada poznata i kao ples svetog Vida, a njegovu vizionarnost potvrđuje i činjenica da se injekcije botulinum toksina i danas koriste u liječenju te diskinezije.(10) Klinička primjena botulinum toksina započela je 1981. kada je Alan B. Scott koristio BoNT/A u liječenju strabizma u animalnim modelima, ali i humanim pacijentima.(11) U narednom se razdoblju indikacijsko područje uporabe BoNT/A brzo proširilo te je registriran za više od 20 indikacija, a njime je tretirano više od 7 milijuna ljudi.(12) Osim intramuskularne primjene u ekstraokularne mišiće u liječenju strabizma, BoNT/A se u oftalmologiji koristi kao jedna od terapijskih opcija u liječenju egzoftalmusa izazvanog distiroidnom orbitopatijom.(13) BoNT/A ima cijeli niz indikacija u liječenju distonijskih poremećaja karakteriziranih spastičnošću skeletnih mišića. Parenteralna primjena BoNT/A izaziva relaksaciju mišića u stanjima hiperaktivnosti mišića kao što su fokalne distonije (cervikobrahijalna distonija, hemifacijalni spazam, blefarospazam i dr.) te spastičnost koja se javlja u sklopu multiple skleroze, moždanog udara i cerebralne paralize. Proširene medicinske indikacije uključuju i stanja kao što su miokimija, bruksizam, tikovi, hiperhidroza, neurogeni mokraćni mjehur, te ahalazija jednjaka.(14–16) Laicima najpoznatija uporaba BoNT/A jest kozmetska, kojom se prema istraživanjima podižu parametri kvalitete života, kao što je percepcija mlađeg osjećanja, samopouzdanje, povišenje raspoloženja i privlačnost. Injekcije BoNT/A su ujedno i najčešće poduzimani kozmetički zahvat u Sjedinjenim Američkim Državama.(17)

1.1.3 Terapijski oblici BoNT/A

Nedugo nakon prve kliničke uporabe BoNT/A u liječenju strabizma, FDA je 1989. godine odobrila primjenu botulinum toksina pod zaštićenim imenom Botox, a ubrzo je isti lijek odobren u Republici Hrvatskoj za liječenje strabizma, hemifacijalnog spazma i blefarospazma.(12,18) U narednih nekoliko godina, u Engleskoj je botulinum toksin registriran pod imenom Dysport, a

slijedili su i ostali oblici BoNT/A kao što su Xeomin, Neuronox i dr.(19,20) Također, početkom novoga tisućljeća započela je uporaba i registracija preparata botulinum toksina skupine B.(21) Upravo su prva dva lijeka, Botox i Dysport i danas najraširenija u kliničkoj primjeni i eksperimentima, a potonji smo koristili u istraživanju koja je ujedno tema mogega diplomskoga rada.

1.1.4 Doze BoNT/A

Izrazito je važno precizno doziranje botulinum toksina i razlikovanja pojedinog oblika zaštićenog lijeka jer su u suprotnom moguće neželjene i ozbiljne nuspojave. Doziranje preparata botulinum toksina se izražava u jedinicama bioaktivnosti i potentnosti (U), a 1 U odgovara LD₅₀ za štakora soja Webster od 18-20g. Letalna doza parenteralno apliciranog BoNT/A u čovjeka nije poznata, a pretpostavlja se da iznosi oko 2700 U za čovjeka mase 70kg, a maksimalna jednokratna doza primijenjenog lijeka za liječenje distonija ne smije iznositi više od 300-400 U. U usporedbi Dysporta s Botoksom, važno je istaknuti različitu potentnost tih dvaju preparata, budući da je omjer ekvivalentosti Dysport/Botox – 4:1.(12,22,23)

1.1.5 Kontraindikacije i nuspojave BoNT/A

Primjena preparata botulinum toksina u terapijske svrhe je kontraindicirana u slučaju preosjetljivosti na toksin ili formulaciju lijeka. Također, BoNT/A se ne smije primjenjivati u slučaju infekcije na mjestu aplikacije. Miastenija gravis, kao bolest neuromišićne spojnice, isto predstavlja kontraindikaciju za terapijsku uporabu BoNT/A. Potreban je dodatan oprez pri istodobnoj primjeni BoNT/A s antikolinergicima, aminoglikozidima te neuromuskularnim blokatorima, zbog mogućeg združenog učinka.(12,22,24) Nuspojave vezane uz uporabu BoNT/A su izrazito rijetke ukoliko se istraživač ili liječnik pridržavaju propisanih protokola. Najčešće nuspojave su one na mjestu uboda, u vidu lokalne iritacije (oteknuće, crvenilo, bol) ili mišićne slabosti i reverzibilne paralize okolnih mišića. Metaanaliza provedena 2004. istražila je različite nuspojave u pacijenata ili dobrovoljaca kojima je apliciran BoNT/A u terapijske ili istraživačke svrhe te nuspojave koje su iskusili oni koji su dobili placebo. 25% onih koji su liječeni botulinum

toksinom je prijavilo lakše do srednje teške nuspojave, u usporedbi s udjelom od 15% onih kojima je dodijeljen placebo. Lokalna slabost je jedina nuspojava dominantno zastupljena u pacijenata kojima je injiciran BoNT/A. U 6 analiziranih studija nije bilo prijavljenih teških nuspojave ili smrtnih slučajeva.(25) Sistemne nuspojave moguće su nakon intravaskularne aplikacije BoNT/A, napredovanjem i tijekom su slične prije opisanoj kliničkoj slici botulizma. Životno ugrožavajuće nuspojave u vidu dispneje i disfagije su također moguće, a prijavljeni su smrtni ishodi.(24)

1.2 Analgetski učinci BoNT/A

Ono što razlikuje botulinum toksin od djelovanja ostalih anestetika, analgetika i ostalih modulatora upale i boli jest da se njegov analgetski učinak ne povećava povišenjem aplicirane doze, odnosno doza od 3.5 U/kg pokazuje jednaki učinak kao i primijenjene doze od 5 i 7 U/kg.(26) Još jedna osobina botulinum toksina kojom se razlikuje od ostalih analgetika jest da ne mijenja bolni prag podražaja u stanjima gdje je on nenarušen, unutar fizioloških granica, nego utječe na modulaciju boli samo onda kada je facilitirana centralnom senzitivacijom, odnosno prisutna je hiperekscitabilnost.(27,28) Tipična dva facilitirana stanja boli jesu alodinija i hiperalgezija. U stanju alodinije osoba ima poremećen osjet za bol, tako da podražaje poput dodira ili neznatnoga povišenja temperature percipira kao bolni podražaj. U hiperalgeziji, osoba percipira osjet bola u većoj mjeri nego što bi osoba normalne senzoričke doživjela bolni podražaj.(29) Ova su dva stanja usko povezana, a uzrok njihova nastanka se na molekularnoj razini nalazi u disregulaciji neuropeptida i medijatora upale. Ovisno o mjestu nastanka alodinija i/ili hiperalgezija može biti periferna i centralna. U perifernom obliku, senzitivacija zahvaća prvi neuron osjetnog puta, a tvari koje sudjeluju u povećanju osjetljivosti receptora na bolne podražaje su bradikinin, PGE2, PGI2, dušikov monoksid, histamin, faktor aktivacije trombocita i dr.(30) U centralnom obliku, senzitivacija se javlja na razini kralježnične moždine ili viših razina spinotalamičkog puta, a poznati su mnogi molekularni čimbenici. Pretjerana aktivacija živčanih završetaka na periferiji uzrokuje povišenje koncentracije peptida povezanog s genom za calcitonin (CGRP-a) i tvari P u prostoru kralježnične moždine te hiperekscitabilnost drugoga neurona puta boli.(31,32) Također, pretjerana aktivacija TRPV1 i NK1 receptora (za tvar P) u dorzalnom rogu kralježnične moždine dovodi do dezinhibicije spinotalamičkog puta, odnosno do pojačanog okidanja bolnih podražaja u talamus.(33)

Prethodno spomenuta raširena uporaba BoNT/A u liječenju mišićnih hiperaktivnosti, poput distonija i spasticiteta, dovela je do uočavanja analgezije kao dodatnog korisnog učinka u ljudi tretiranih intramuskularnim injekcijama. U svijetu najraširenija uporaba botulinum toksina u svrhu smanjenja facijalnih bora dovela je do olakšanja tegoba mnogih pacijenata koji su imali i migrenu. Botulinum toksin se, za olakšanje simptoma kronične migrene koja traje minimalno 15 dana u mjesecu, koristi od 2010. godine. Migrena je, kao tip srednje jake do jake glavobolje, jedina odobrena indikacija za uporabu botulinum toksina koja nema neuromuskularnu podlogu boli.(34,35) Osim u liječenju migrene, provedena su brojna istraživanja koja govore u prilog o povoljnom učinku BoN/T u terapiji raznih bolnih sindroma kao što su osteoartritis, fantomska bol te razni oblici neuropatske boli.(3–5,36–39) Zbog djelovanja na ne-mišićne tipove boli postavljena su pitanja djeluje li botulinum toksin na oslobađanje još nekoga neurotransmitera uz ACh, na drugome mjestu djelovanja, primjerice iz vezikula nociceptora.(40) Mehanizme kojima BoNT/A ublažava simptome migrene, bolnih sindroma kao i prethodno opisano olakšavanje boli u pacijenata s hiperaktivnošću mišića, nije moguće objasniti samo osnovnim i općeprihvaćenim djelovanjem na neuromišićnoj spojnici, te su u zadnjih dvadesetak godina provedena istraživanja u svrhu definiranja farmakodinamike botulinum toksina u modulaciji boli. Istraživanja provedena in vitro metodama, kao i ex vivo i in vivo eksperimenti na životinjskim modelima, pokazala su da BoNT/A, proteolizom SNARE proteina, inhibira otpuštanje CGRP-a, glutamata, kao i tvari P iz živčanih završetaka senzornih neurona.(41–46) Navedene molekule sudjeluju u modulaciji i transmisiji bolnih podražaja. Također, u animalnim modelima je dokazana smanjena ekspresija c-fos protoonkogena, markera aktivacije neurona u dorzalnog rogu produžene i leđne moždine životinja tretiranih botulinum toksinom.(47,48) Od početka prošloga desetljeća dominantna je hipoteza kako BoNT/A svoj analgetski učinak, slično onome antikolinergičnome, ostvaruje smanjenjem otpuštanja neurotransmitera iz perifernih živčanih završetaka primarnog aferentnog neurona. BoNT/A je u tim istraživanjima djelovao u drugoj fazi upale šape životinje izazvane formalinom smanjujući edem, umanjujući bol te snižujući razinu izlučenog lokalnog glutamata. BoNT/A nije djelovao akutno na upalu, njegov antinociceptivni učinak je počeo nakon 5 sati od primjene, a potrajao je minimalno 12 dana. Opažena snižena aktivnost neurona drugoga reda, onih u središnjem živčanom sustavu, smatrala se posljedicom smanjenog intenziteta slanja živčanih impulsa s periferije.(45,49,50) Međutim, monogobrojna istraživanja, poglavito iz našeg

laboratorija, su pokazala da se antinociceptivni učinak BoNT/A ne može objasniti isključivo perifernim djelovanjem (Odjeljak 1.4, u daljnjem tekstu)

1.3 Upala

1.3.1 Neurogena upala

Neurogena upala je aseptična vrsta upale izazvana ili potencirana molekulama otpuštenima iz završetaka aferentnih neurona. Aktivacija senzornih završetaka lokalnim podražajem, aksonalnim refleksom ili refleksom dorzalnih korijenova rezultira otpuštanjem vazoaktivnih tvari.(51) Početak neurogene upale nastupa otpuštanjem upalnih neuropeptida iz završetaka slabo mijeliniziranih A δ i nemijeliniziranih C senzornih vlakana. Ta vlakna su podražena aktivacijom TRPV1 membranskih ionskih kanala toplinskim podražajem, ali na aktivaciju TRPV1 djeluju i tvari kao što su kapsaicin, H⁺ ioni te bradikinin. Otvaranjem neselektivnih TRPV1 kanala dolazi do ulaska natrijevih i kalcijevih iona, a nakupljanje kalcijevih iona u stanici dovodi do egzocitoze vezikula neuropeptida.(52,53) U neuropeptide izlučene iz živčanih završetaka, tipične medijatore neurogene upale, ubrajaju se tvar P, neurokinin A, te peptid povezan s genom za kalcitonin (CGRP). Navedeni peptidni neurotransmiteri djeluju lokalno na ciljne stanice periferije kao što mastociti, neutrofili i glatki mišići krvnih žila uzrokujući simptome tipične za upalu: crvenilo, toplina, oteknuće i bol. Ti simptomi su rezultat vazodilatacije krvnih žila, njihove povećane propusnosti za plazmatske bjelancevine te hipersenzibilnosti živčanih vlakana koje inerviraju noksom zahvaćeno područje. Neurogena je upala rezultat zajedničkog učinka i pozitivne povratne sprege između inflamatornih neuropeptida i upalnih stanica sa svojim medijatorima. Smatra se da se isti mehanizam odvija i na razini kralježnične moždine uzrokujući centralnu hipersenzitaciju.(51)

1.3.2 Imunogena upala

Važnost adekvatnog upalnog odgovora organizma u svrhu limitiranja ozljede uzrokovane noksom, najbolje se može uočiti na primjeru infekcije. Neuro-imuno interakcija na tjelesnim barijerama ima veliku ulogu u odgovoru na oštećenje tkiva. Nekrotizirajući fasciitis, po život opasna infekcija, uzrokovana je brojnim patogenima, no najčešći i najletalniji uzročnik je *Streptococcus pyogenes*. Virulencija te bakterije je ovisna o mogućnošću inhibicije ili rezistencije nad upalnim stanicama domaćina. Ta bakterija producira toksin streptolizin S koji suprimira normalnu neuralnu modulaciju imunog odgovora. Neadekvatan, odnosno smanjen upalni odgovor domaćina, streptolizin S postiže djelovanjem na neurone nociceptora, u nižim koncentracijama sa selektivnošću za TRPV1 receptore.(54) Taj je učinak neovisan o upalnim medijatorima i o upalnim stanicama. Podraženi TRPV1 neuroni parakrino otpuštaju CGRP, koji suprimira regrutaciju i baktericidnu aktivnost neutrofila, stanica odgovornih za sprječavanje širenja infekcije β -hemolitičkim streptokokom. Nedavno eksperimentalno istraživanje na miševima je pokazalo da djelovanje na opisani patofiziološki mehanizam inhibitorom CGRP-a, te perifernom aplikacijom BoNT/A može se smanjiti upala prouzročena streptolizinom S.(54)

1.4 Djeluje li BoNT/A periferno i/ili centralno?

Djelovanje BoNT/A na opisane mehanizme nastanka neurogene i imunogene upale moguće je na nekoliko razina, BoNT/A inhibira izlučivanje CGRP-a, tvari P iz završetaka perifernih aferentnih neurona, ganglija stražnjeg roga, te dendrita senzornog neurona dorzalnog roga cijepanjem SNARE proteina.(55,56) BoNT/A smanjuje povišenu ekspresiju proteina TRPV1 u eksperimentalnom modelu artritisa.(55)

Tvrdnja da BoNT istovjetno djeluje periferno i analgetski i protuupalno dovedena je u pitanje kod modela upale i boli izazvane kapsaicinom ili karagenanom.(26,57) U tim pokusima, BoNT/A je smanjio bol, ali je izostao protuupalni učinak smanjenja edema i ektravazacije plazmatskih proteina. Slijedom tih istraživanja, provedeni su eksperimenti koji bi ispitali potencijalni aksonalni transport botulinum toksina u centralni živčani sustav sličan onome toksinu tetanusa. Štakorima je intramuskularno injicirana kisela fiziološka otopina koja je uzrokovala bilateralnu bol centralnog podrijetla. Botulinum toksin je smanjio bol na obje strane (kod unilateralne primjene), što se ne

može potkrijepiti samo učinkom na završetke prvog neurona senzornog puta. Još jedan dokaz koji govori u prilog centralnome djelovanju BoNT/A jest inhibicija bilateralnog antinociceptivnog djelovanja injiciranjem kolhicina, blokatora aksonalnog transporta.(57,58) Sukladno tome, analgetski učinak BoNT/A apliciranog direktno u intratekalni prostor nastupa unutar jednoga dana, dok antinociceptivni učinak BoNT/A injiciranog periferno započinje nakon 3 do 7 dana.(59) Prethodna istraživanja provedena u našem laboratoriju su pokazala kako BoNT/A smanjuje neurogenu upalu i alodiniju u udaljenom području kranijalne dure, nakon indukcije upale temporomandibularnog zgloba.(60,61) Učinak je izostao primjenom opioidnog antagonista naltreksona, što ukazuje da je djelovanje na smanjenje ekstrasvazacije proteina u duri i analgetski učinak posredovan sustavom endogenih opioida.(6) Međutim, u opisanom pokusu, periferno djelujući metilnaltrekson nije smanjio učinak BoNT/A na neurogenu upalu dure, što se može objasniti jedino središnjim djelovanjem BoNT/A na upalu. Također, na isti način je pokazano da morfijem uzrokovano smanjenje neurogene upale dure ovisi o njegovom središnjem učinku.

U ovome istraživanju htjeli smo, sukladno središnjem analgetskom učinku i pokazateljima da njegov središnji učinak utječe na neurogenu upalu, istražiti mogućnost centralnog djelovanja botulinum toksina na smanjenje imunogene upale.

2 Hipoteza

Pretpostavka ovoga istraživanja jest da bi botulinum toksin tipa A mogao smanjiti upalu zgloba djelovanjem u središnjem živčanom sustavu.

3 Ciljevi rada

- Istražiti može li središnje primijenjeni BoNT/A kao predtretman djelovati na edem i propusnost krvnih žila kod akutne upale koljena.
- Usporediti njegov učinak s intraartikularnim predtretmanom botulinum toksinom.
- Ispitati podudaraju li se protuupalni učinci ta dva načina primjene s djelovanjem na nociceptivni odgovor izazvan pritiskom na zglob.

4 Materijali i metode

4.1 Eksperimentalne životinje

U svrhu izrade ovoga diplomskog rada eksperiment je proveden na 29 odraslih mužjaka štakora, soja Wistar, starosti 4 mjeseca i mase 350-500 grama. Životinje su uzgojene na Zavodu za farmakologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu, s održanim ciklusom noć-dan pomoću automatskog paljenja i gašenja svjetla svakih 12 sati u prostoriji u kojoj su čuvani. Životinje su bile smještene u kavezima po dvije ili tri jedinke sa slobodnim pristupom hrani i vodi. Aklimatizacija i eksperimentalna bihevioralna mjerenja su provedeni u istoj prostoriji u približno isto doba svakoga dana. Životinje su vagane svakih nekoliko dana zbog kontrole njihovog općeg stanja. O planiranju i provođenju svih koraka ovog eksperimenta poštovala su se 3 osnovna etička načela postupanja s pokusnim životinjama: zamjena, smanjivanje broja korištenih životinja i poboljšanje uvjeta eksperimenata.(62) Također poštovane su odredbe Zakona o zaštiti životinja donesenog od strane Hrvatskog sabora 2017. godine kao i preporuke Međunarodnog udruženja za proučavanje boli.(63) Pokus je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Ur. Broj:380-59-10106-19-111/138 Klasa:641-01/19-04/01).

4.2 Ispitivane tvari i tvari korištene za indukciju upale

4.2.1 Botulinum toksin tipa A

Komercijalni pripravak BoNT/A (Dysport ®, Ipsen, Pariz, Francuska) koji sadrži 500 standardnih internacionalnih jedinica (500 U) BoNT/A (1 U jednaka je dozi od 1 LD₅₀ u miševa) je otopljen u fiziološkoj otopini u koncentraciji 1 U/1 ul, alikvotiran i dalje čuvan na -20 °C. Prije primjene u životinja, alikvotirani toksin je otopljen i razrijeđen.

4.2.2. Kompletni Freundov adjuvans

1 ml pripravka kompletnog Freundovog adjuvansa (CFA) (SIGMA F 5881, Saint Louis, Missouri, SAD) sadrži 1 mg toplinski umrtvljenog bacila *Mycobacterium tuberculosis*, 0.85 mL parafinskog

ulja i 0.15 mL emulgatora manidnog oleata. CFA se nakon vorteksiranja primjenjuje bez otapanja, te je 50 μ L injicirano u zglob životinja s namjerom indukcije upale.

4.3. Eksperimentalni postupci

4.3.1. Primjena botulinum toksina i CFA u koljeno

Ketamin/ksilazin je injiciran laboratorijskim životinjama intraperitonealno, u dozama od 70 mg/kg ketamina + 7 mg/kg ksilazina, prije aplikacije BoNT/A i CFA u intraartikularni prostor koljena pa su životinje tijekom tih dijelova eksperimenta bile u dubokoj anesteziji. Potvrdili smo uspavanost izostankom odgovora na bolni podražaj primijenjen na šapu životinje. Jednoj skupini životinja je apliciran BoNT/A u dozi od 7 U/kg u 20 μ L u intraartikularni prostor desnoga koljena, koristeći inzulinske igle od 30G. U ovome eksperimentu je, 7 dana nakon aplikacije botulinum toksina, trima eksperimentalnim skupinama životinjama u sinovijalni prostor desnoga koljenskoga zgloba injicirano 50 μ L nerazrijeđenog CFA iglom od 30G. Točno mjesto uboda je provjereno i.a. aplikacijom metilenskog modrila dvama žrtvovanim životinjama, prije provođenja pokusa s BoNT/A. (slika 1)



Slika 1: Provjera mjesta unosa ispitivanih tvari u istraživanju prethodnim injiciranjem metilenskoga modrila.

4.3.2. Primjena botulinum toksina u intratekalni lumbarni prostor

Jednoj od četiriju laboratorijskih ispitivanih skupina je BoNTA, u dozi od 2 U/kg (volumen 10 μ l), te koristeći inzulinske igle od 28 G, injiciran u intratekalni prostor na razini L3-L4. Životinje su duboko anestetizirane (70mg/kg ketamina + 7 mg/kg ksilazina). Ubodno mjesto je zatim preparirano šišanjem životinje u anesteziji za skraćenje dlake i dezinfekcijom krzna pamučnom vatom natopljenom 70% etanolom. Nakon toga je učinjena mala incizija od 2 cm za precizniju punkciju spinalnog prostora. Precizno mjesto injekcije je bilo provjereno pokretom repa ili noge anestetizirane životinje. Zatim je koža štakora zašivena neresorptivnim kirurškim koncem (Mersilk 5-0, Ethicon, Livingstone, Ujedinjeno Kraljevstvo).

4.4 Eksperimentalne metode korištene u kvantificiranju izazvane upale i boli

4.4.1 Određivanje edema mjerenjem promjera upaljenoga zgloba

Za kvantificiranje edema, odnosno otekline, određivao se promjer u milimetrima desnog i lijevog koljena životinje koristeći pomičnu mjerku. Promjer koljena je mjeran 7 dana nakon BoNT/A, odnosno prije aplikacije CFA u koljenski zglob, te u naredna dva dana, 24 i 48 h nakon injekcije CFA.

4.4.2 Određivanje propusnosti krvnih žila za proteine plazme mjerenjem tkivne ekstravazacije plazmatskih bjelančevina u kompleksu s Evans Blue bojom

U ovome eksperimentu određivala se koncentracija Evans blue boje, intravenski injicirane životinjama na dan žrtvovanja. Pri davanju Evans blue boje u repnu venu, životinje su anestetizirane izofluranom, uz napomenu da je pri indukciji korišten 5%-tni, a pri održavanju 2.5%-tni izofluran.

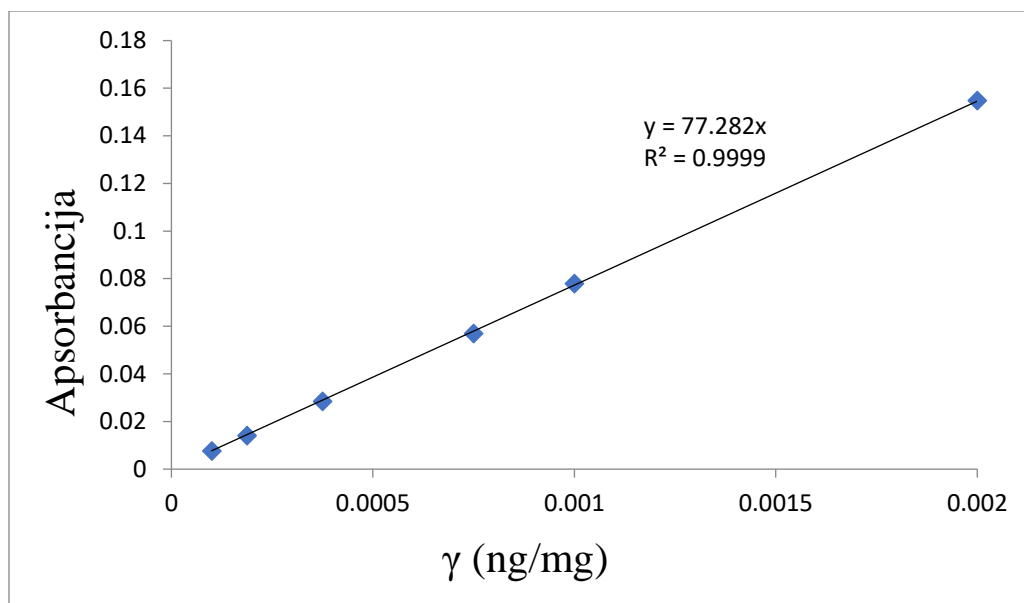
Čestice Evans blue boje se vežu za proteine plazme, te je koncentracija tih čestica u odstranjenom sinovijalnom tkivu koljena ekvivalentna koncentraciji ekstrahiranih proteina plazme. (slika 2) Evans Blue boja je iz tkiva izmjerene mase ekstrahirana pomoću 2 mL organskoga otapala formamida pohranjivanjem u inkubatoru na 37°C minimalno 48 h. Nakon 3 dana ekstrahiranja, očitana je apsorbancija uzorka izmjerena pri prolasku svjetlosti od 620 nm. Za očitavanje apsorbancije koristili smo ISKRA HPV 220 spektrofotometar. Slijedeći principe Beer-Lambertova zakona, uz poznate apsorbanciju i koncentraciju standarda, izračunate su koncentracije svakoga pojedinoga uzorka koristeći izraz:

$$\gamma (\text{uzorka}) / A (\text{uzorka}) = \gamma (\text{standarda}) / A (\text{standarda}),$$

gdje γ predstavlja masenu koncentraciju, a oznaka A izmjerenu apsorbanciju.(64)



Slika 2: Strjelicom je označena preparirana sinovijalna membrana koljenskoga zgloba štakora. Ekstravazacija plazmatskih proteina je mjerena koncentracijom Evans blue boje unutar sinovijalne membrane.



Slika 3: Baždarna krivulja spektrofotometra. Na krivulji su prikazane vrijednosti apsorbancije dobivene na 620 nm u ovisnosti o standardima određene masene koncentracije otopine Evans blue u formamidu.

4.4.3 Mjerenje bolnih podražaja metodom PAM

Osjetljivost na mehanički podražaj je kvantificiran pomoću uređaja koji je mjerio postupno povećanje pritiska (Pressure application measurement – PAM) na zglob koljena ili šape životinje izražen u gramima po sekundi. Brzina povećanja pritiska na koljenski zglob određena je testiranjem uređaja prije početka eksperimenta i proučavanjem literature u kojim je PAM uređaj prethodno korišten, te je u našem eksperimentu iznosila 50g/s.(65,66) Jedna od prednosti ove metode je mogućnost vizualne kontrole jačine pritiska, ostvarene svojim palcom, tijekom korištenja PAM uređaja, što uvelike pridonosi objektivizaciji boli. Mehanički nociceptivni podražaj pomoću PAM uređaja je ispitivan u dvama mjerenjima bilateralno svakoj životinji na dan kada je apliciran CFA, te u naredna dva dana. Prag koji je označavao početak bolnog podražaja u životinji se smatrao dostignutim u slučaju povlačenja komprimirane noge, vokalizacije, te opiranja životinje a očitao je na PAM uređaju nakon prestanka kompresije zgloba koljena.

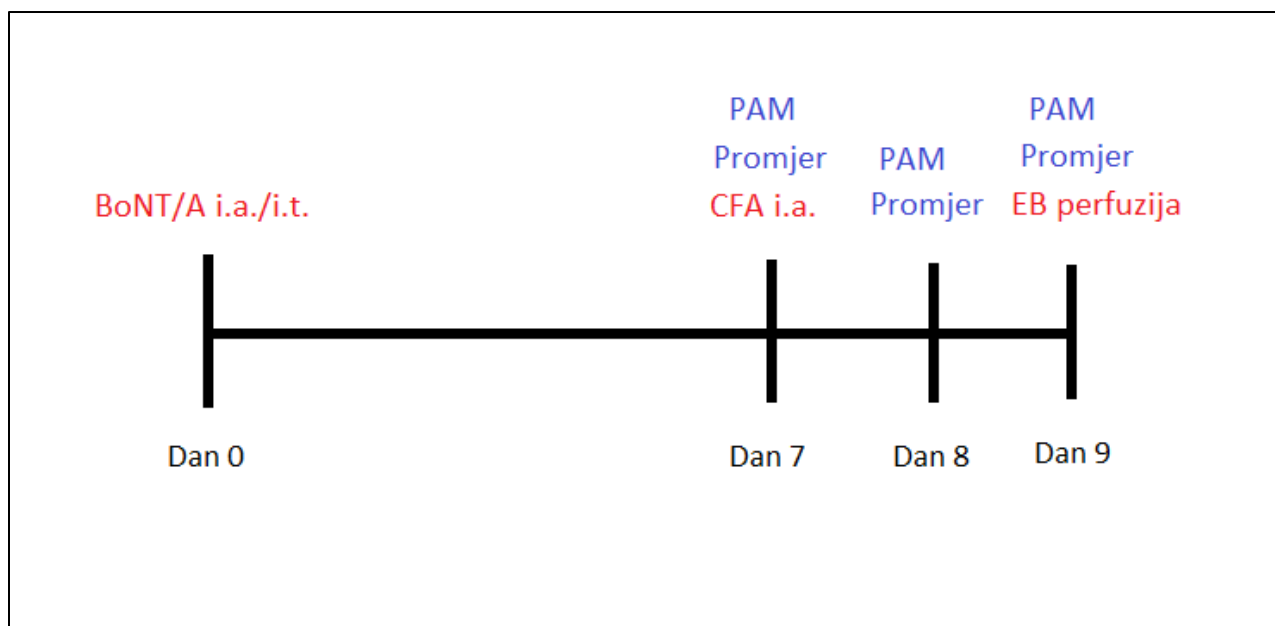
4.5 Eksperimentalni dizajn

4.5.1 Skupine životinja

29 muških Wistar štakora je randomizacijom podijeljeno u 4 eksperimentalne skupine životinja po 7 ili 8 životinja. Prvoj, kontrolnoj skupini životinja, je injicirana fiziološka otopina u sinovijalni prostor koljena. Drugoj skupini životinja je sedmog dana pokusa intraartikularno u desno koljeno apliciran CFA. Treća skupina životinja je primila BoNT/A u sinovijalni prostor desnoga koljena, a četvrtoj je skupini injiciran botulinum toksin u intratekalni prostor. 7 dana nakon što je dvjema skupinama apliciran BoNT/A, životinjama je inducirana upala s CFA. (Tablica 1)

Tablica 1: eksperimentalne skupine životinja

Broj skupine	Skupine sa svim tretmanima	Broj životinja u skupini
1.	fiz. (i.a.) + fiz. (i.t.) + fiz. (i.a.)	7
2.	fiz. (i.a.) + fiz. (i.t.) + CFA (i.a.)	8
3.	BoNT/A (i.a.) + fiz. (i.t.) + CFA (i.a.)	7
4.	BoNT/A (i.t.) + fiz (i.a.) + CFA (i.a.)	7



Slika 4: Vremenski slijed eksperimentalnih postupaka i mjerenja. Prvog dana istraživanja apliciran je BoNT/A intraartikularno ili intratekalno. Sedmoga dana injicirana je CFA intraartikularno te su izmjerene osnovne vrijednosti promjera koljena te odgovora na nocicepciju metodom PAM. Devetoga dana su životinje perfundirane Evans blue bojom. Budući da smo u ovome eksperimentu promatrali učinke BoNT/A na smanjenje akutne upale, mjerenje bihevioralnog odgovora metodom PAM i promjera koljenskog zgloba smo provodili 24 sata i 48 sati nakon injiciranja CFA. Ekstravazacija proteina metodom spektrofotometrije je izmjerena 2 dana nakon perfuzije životinja.

4.6 Statistička obrada rezultata istraživanja

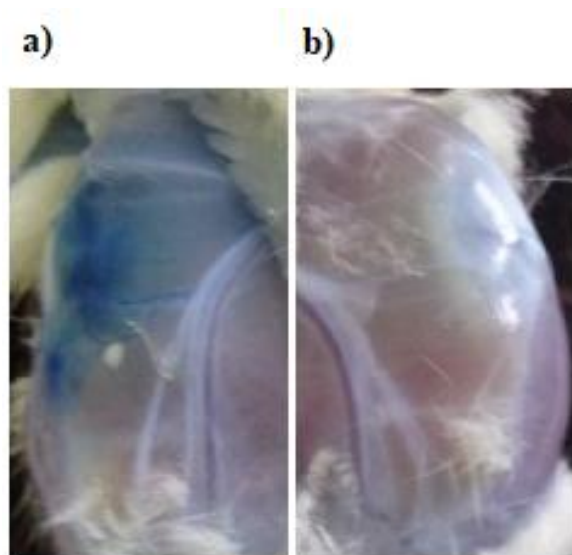
Za statističku analiza podataka ekstravazacije plazmatskih bjelančevina korištena je jednosmjerna analiza varijance (engl. *one way analysis of variance* (ANOVA)), s Newman-Keuls-ovim *post hoc* testom višestrukih usporedbi između različitih eksperimentalnih grupa. Za statističku analizu rezultata promjene dijametra i utjecaja na nocicepciju korištena je dvosmjerna analiza varijance za ponovljena mjerenja (engl. *two-way repeated measures* ANOVA (two-way RM ANOVA)), a statistička značajnost između eksperimentalnih grupa s Bonferronijevim *post hoc* testom. Rezultati

su prikazani kao aritmetičke sredine i standardne pogreške aritmetičke sredine (SEM). Statistički značajnom se smatrala vrijednost p manja od 0.05 ($p < 0.05$). Za statističku obradu dobivenih podataka je korišten program GraphPad Prism v.5.00 (GraphPad Software, San Diego, California, SAD).

5 Rezultati

5.1 CFA

Prema našim očekivanjima, slijedeći iskustva iz ovoga laboratorija i konceptualno slična istraživanja, CFA je inducirao snažan imunološki odgovor laboratorijskih životinja vidljiv i ljudskih okom usporedbom intenziteta plave boje (proporcionalan ekstravazaciji Evans Blue-proteinskih kompleksa) dvaju koljena različitih strana u iste životinje (slika 4).(67) U usporedbi sa skupinom kojoj je administrirana fiziološka otopina, skupina životinja kojoj je intraartikularno injicirana CFA imala je statistički značajne veće dijemetre desnoga koljena. Koncentracija ekstravaziranih proteina, mjerena preko EB boje, je također bila veća nego u kontrolnoj, prvoj skupini.

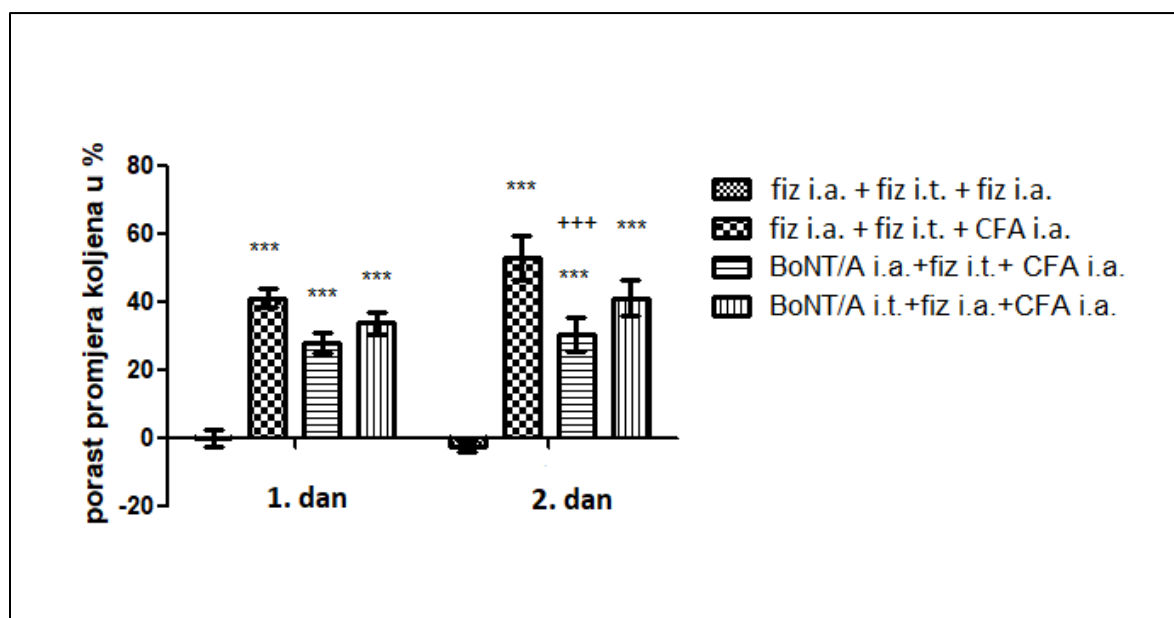


Slika 4: Fotografija dvaju područja koljena iste životinje kojoj je inducirana upala u desnome zglobu s CFA. Na slici a) je vidljivo plavičasto obojenje uzrokovano ekstravazacijom Evans blue boje. Na slici b) to obojenje nije prisutno budući da je CFA aplicirana unilateralno.

5.2 Učinci botulinum toksina na upalne parametre

5.2.1 Edem

Rezultati su pokazali da je aplikacija BoNT/A direktno u koljenski zglob statistički značajno umanjila prvi parametar upale izazvana s CFA, oteklinu. Skupina koja je prije injekcije CFA dobila i botulinum toksin imala je za 22.60 ± 2.99 % manji promjer desnoga koljena u odnosu na skupinu kojoj nije apliciran BoNT/A, nego samo CFA (slika 5). Učinak na smanjenje bio je veći drugoga dana mjerenja. Iako postoji tendencija smanjenja dijametra koljena kod skupine životinja kojoj je BoNT/A injiciran intratekalno u odnosu na kontrolnu skupinu kojoj je apliciran CFA, to smanjenje nije bilo statistički značajno.

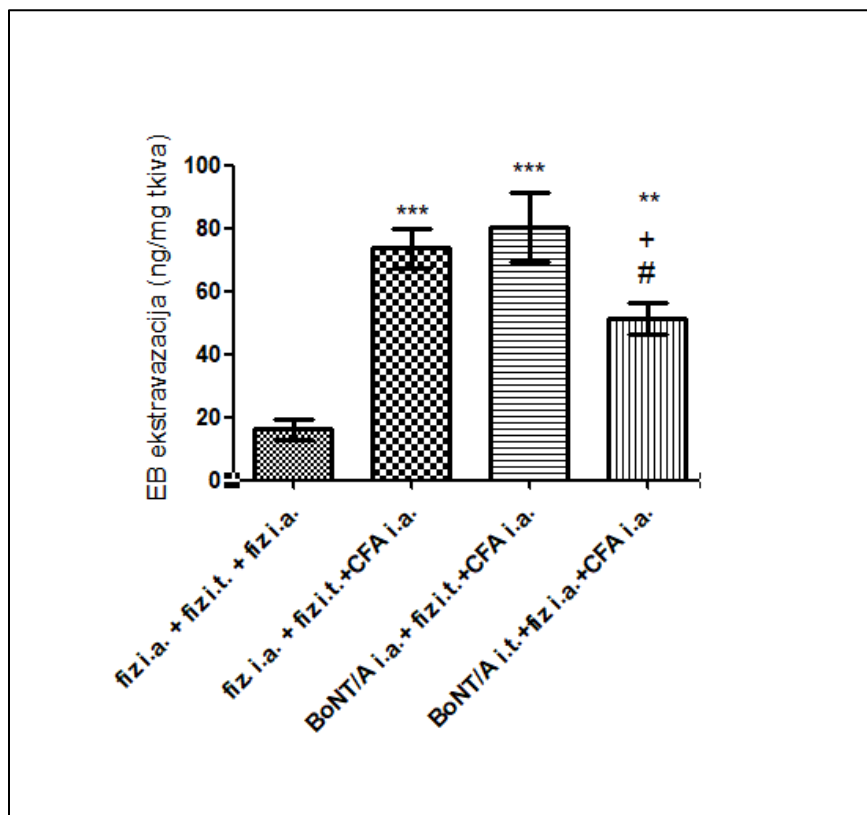


Slika 5: Utjecaj periferno i središnje primijenjenog BoNT/A na edem koljena. Životinje su predtretirane s BoNT/A (2 U/kg i.t./10 μ L ili 7 U/kg i.a./20 μ L), a upala je izazvana injiciranjem 50 μ l CFA u koljeno 7. dan nakon BoNT/A. U pojedine životinje edem je izračunat kao postotna promjena promjera koljena nakon izazivanja upale, u odnosu na vrijednost prije upale kod pojedine životinje.

fiz - fiziološka otopina. ***- $p < 0.001$ u usporedbi s fiz i.a. + fiz i.t. + fiz i.a.; +++- $p < 0.001$ u usporedbi s fiz i.a. + fiz i.t. + CFA i.a. (Analiza varijance za ponovljena mjerenja, i Bonferronijev *post hoc* test; $p < 0.05$ se smatrala statistički značajnom)

5.2.2 Ekstravazacija plazmatskih bjelančevina

Učinak na drugi mjereni parametar upale, smanjenje izlaska intravaskularnih bjelančevina u međustanični prostor, u ovom slučaju sinovijalni prostor koljena, bio je statistički značajan samo u skupini životinja kojoj je BoNT/A dostavljen u intratekalni prostor. U toj skupini je masena koncentracija ekstravaziranih proteina iznosila 51.53 ± 5.05 ng/mg uklonjenog sinovijalnog tkiva dok je u skupini eksperimentalnih životinja kojoj je upala izazvana s CFA, bez aplikacije BoNT/A, masena koncentracija iznosila 73.62 ± 6.37 ng/mg. Smanjenje izlaska plazmatskih bjelančevina nije opaženo u skupini kojoj je BoNT/A injiciran intraartikularno, u usporedbi sa skupinom koja je dobila samo CFA (slika 6).



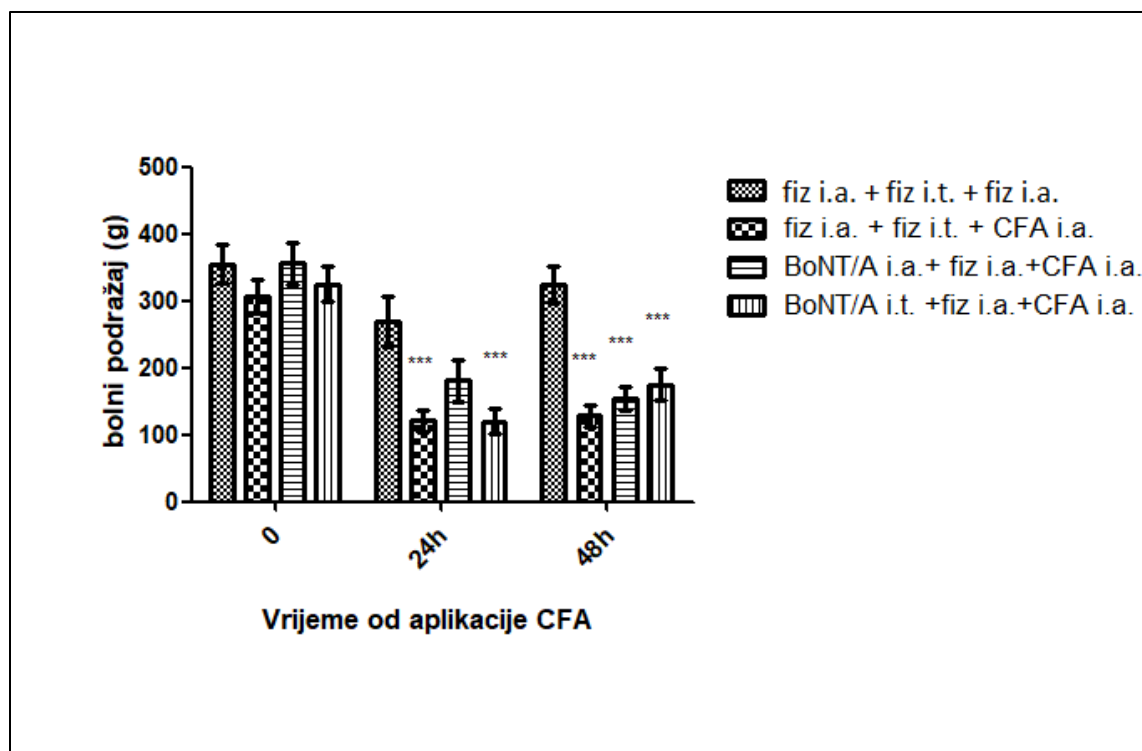
Slika 6: Utjecaj periferno i središnje primijenjenog BoNT/A na ekstravazaciju Evans blue boje u uklonjenom tkivu koljena pojedinih skupina životinja. Životinje su predtretirane s BoNT/A (2 U/kg i.t./2 µL ili 7 U/kg i.a./20 µL), a upala je izazvana injiciranjem 50 µL CFA u koljeno 7. dan nakon BoNT/A.

***- $p < 0.001$ u usporedbi s fiz i.a. + fiz i.t. + fiz i.a; +- $p < 0.05$ u usporedbi sa skupinom fiz i.a. + fiz i.t. + CFA i.a. ; #- $p < 0.05$ u usporedbi sa skupinom BoNT/A i.a. + fiz i.t. + CFA i.a.

(Jednosmjerna analiza varijance i Newman-Keulsov *post hoc* test; $p < 0.05$ se smatrala statistički značajnom)

5.3 Učinak BoNT/A na nocicepciju

U ovome je eksperimentu prag boli, izražen u gramima, određen mehaničkim podražajem na koljenski zglobov i šapu štakora. CFA primijenjen u zglobov je smanjio prag podražaja. Za razliku od dosadašnjih istraživanja, koristeći PAM metodu testiranja bolnog podražaja, učinak botulinum toksina na smanjenje boli u neurogenoj upali, nije bio opažen niti statistički značajan. (26,58,59,68) (slika 7)



Slika 7: Utjecaj periferno i središnje primijenjenog BoNT/A na bihevioralni odgovor životinje na bolni podražaj pritiskom zglobova. Životinje su predtretirane s BoNT/A (2 U/kg i.t./2 μ L ili 7 U/kg i.a./20 μ L), a upala je izazvana injiciranjem 50 μ L CFA u koljeno 7. dan nakon BoNT/A. BoNT/A nije ostvario statistički značajan učinak na pritisak pri kojem je bio vidljiv nociceptivni odgovor (mehanički prag boli).

***- $p < 0.001$ u usporedbi s fiz i.a. + fiz i.t. + fiz i.a. (Analiza varijance za ponovljena mjerenja, i Bonferronijev *post hoc* test; $p < 0.05$ se smatrala statistički značajnom)

6 Rasprava

6.1 Izazivanje akutne imunogene upale pomoću CFA

U našem istraživanju smo koristili CFA kao eksperimentalnu tvar za izazivanje imunogene upale, koja se vrlo često koristi u istraživanjima na eksperimentalnih miševima i štakorima.(61,67,69,70) Adjuvansi su kemijske tvari koje povećavaju imunogenost antigena te tako pojačavaju imuni odgovor biološkog organizma, kako urođene, tako i specifične imunosti budući da utječu na specifičnost prepoznavanja epitopa. Zbog tih svojih svojstava, adjuvansi su svoju najširu upotrebu našli u vakcinaciji ljudi.(71,72) CFA, adjuvans korišten u ovome pokusu, se sastoji od emulzije inaktiviranog i osušenog bacila *M. tuberculosis* i smjese lipidnih otopina. Patofiziološki slijed kojim CFA inducira akutnu upalu, onu promatranu u ovome pokusu, uključuje brzu fagocitozu predočnim imunološkim stanicama, lučenje citokina od strane mononuklearnih stanica te aktivacija i proliferacija pomoćničkih CD4⁺ T-limfocita. Budući da se u sastavu CFA nalaze antigeni mikobakterije, nastupa Th1 imuni odgovor CD4⁺ limfocita te se lučenjem IFN γ i TNF β potiče imunološki odgovor usmjeren na stanične patogene.(73). Uobičajeno je da se CFA koristi za izazivanje kronične upale zbog dugotrajnog učinka. U ovom pokusu, učinak CFA je mjeran u akutnom periodu upale, tj. unutar 2 dana od njenog izazivanja. Takav vremenski period je određen na osnovu preliminarog pokusa u kojem smo utvrdili da intenzitet ektravazacije i boli kod upale koljena slabi nakon nekoliko dana.

6.2 BoNT/A smanjuje mjerene parametre upale

Cilj ovoga eksperimenta bio je, nadovezujući se na brojna istraživanja provedena u ovome i ostalim laboratorijima, ispitati protuupalna i antinociceptivna svojstva botulinum toksina.(28,35,55–60,74) Ovaj eksperiment je pokazao kako botulinum toksin utječe na upalnu reakciju, smanjujući njezine razmjere. Ono što su rezultati također pokazali jest da učinak BoNT/A ovisi o mjestu djelovanja, imajući statistički značajan učinak na smanjenje otekline upaljenoga koljena kada je apliciran periferno - direktno u upaljeni zglob, dok je efekt na smanjenje ektravazacije plazmatskih bjelancevina uočen samo kod BoNT/A injiciranoga u intratekalni prostor, dakle u središnji živčani sustav. O mehanizmima točnog djelovanja BoNT/A na redukciju

neurogene upale ne zna se mnogo, te su potrebna buduća istraživanja za utvrđivanje molekularne podloge tih učinaka.

6.3 Učinak na smanjenje boli metodom PAM nije opažen

Premda su dosadašnja istraživanja nocicepcije metodom PAM pokazala kako BoNT/A povisuje prag boli u odnosu na kontrolne životinje kojima nije administriran BoNT/A, u našim mjerenjima taj analgetski učinak nije opažen.(65,66) Iako su laboratorijske životinje prilikom manualne manipulacije, hvatanja i držanja pokazivale bolne facijalne ekspresije i vokalizaciju, što je bilo indikativno da upala inducirana s CFA uzrokuje i popratnu bol, mjerenje PAM uređajem nije zabilježilo statistički značajnu promjenu praga bolnog podražaja, kako u usporedbi kontrolne skupine životinja sa skupinom kojoj je injiciran CFA, tako ni usporedbom prethodno navedene skupine i dvaju skupina kojoj je apliciran BoNT/A (i.t. ili i.a.).

6.4 Usporedba perifernih i središnjih učinaka BoNT/A na upalu

Brojna istraživanja posljednjih godina o analgetskom učinku botulinum toksina govore u prilog predominantno centralnom učinku u modulaciji boli, i to na razini primarnih senzornih jezgara produžene ili leđne moždine u koje pristiže aksonalnim transportom.(28) Rezultatima tih istraživanja je dovedena u pitanje dotad prihvaćena teorija o inhibiciji oslobađanja neurotransmitera na periferiji kao glavnog mehanizma antinociceptivnog učinka BoNT/A. Također, rezultati eksperimenata provedenih na životinjama ukazuju na različit protuupalni i analgetski učinak BoNT/A. U modelima inducirane upale često je izostajao učinak na smanjenje otekline i ektravazacije, ili je za vidljiv protuupalni učinak bila potrebna doza koja je viša od minimalne doze potrebne za analgetski učinak.(57,67,75) Mehanizmi djelovanja BoNT/A na redukciju upale nisu još posve usuglašeni. Posljednja istraživanja iz našeg laboratorija govore o posredovanju učinka preko sustava endogenih opioda i GABA-ergičnog sustava.(6) Postiže li BoNT/A dio svojih protuupalnih učinaka djelovanjem u perifernom živčanom sustavu, ili su oni rezultat centralnog djelovanja, pokazat će buduća istraživanja. Rezultati ovoga istraživanja su pokazali disocijaciju učinka BoNT/A primijenjenog na periferiji u odnosu na središnje primijenjen

toksin, na smanjenje različitih pokazatelja upale: otekline (edema) i ektravazacije. BoNT/A primijenjen u koljeno je smanjio edem koljena koji nastupa zbog jake imunogene upalne reakcije posredovane s CFA. Međutim, BoNT/A nakon takve primjene nije smanjio ektravazaciju proteina plazme u tkivo koljena. Obrnuto, nakon primjene BoNT/A na razini spinalnog segmenta leđne moždine, ektravazacija proteina plazme je bila smanjena u odnosu na kontrolnu skupinu s upalom, dok se sam intenzitet edema nije smanjio. Takve razlike u djelovanju BoNT/A bi se mogle objasniti i različitim mehanizmima djelovanja na upalu ovisno o mjestu primjene.

Edem kao reakcija na upalu je posredovan povećanom permeabilnošću krvnih kapilara. Povećana propusnost krvnih žila nastaje pod utjecajem medijatora upale koji se luče iz senzornih živčanih završetaka, primarno tvari P i CGRP-a koji posreduju ektravazaciju proteina plazme i vazodilataciju. Međutim, osim senzoričkih završetaka, intenzitet edema se nalazi pod utjecajem tkivnih mastocita ili samih ektravaziranih leukocita, prvenstveno neutrofila i makrofaga. Navedene stanice luče molekule kao što su matriks metaloproteinaze, katepsin, kisikovi radikali te proupalni citokini čija aktivnost degradira ekstracelularni matriks. Gubitkom njegove strukture i funkcije intersticijski tlak tekućina se ne uspijeva oduprijeti intravaskularnom tlaku te dolazi do nastanka edema.(76) Regrutacija i aktivnost leukocita, ali i sama vaskularna permeabilnost, osim senzornih završetaka je i pod jakim utjecajem simpatičkog živčanog sustava.(77–79) Teoretski, moguće je da lokalno primijenjen BoNT/A djeluje na živčane završetke simpatikusa i lučenje noradrenalina, što bi možda moglo objasniti smanjenje edema bez djelovanja na sami intenzitet neurogene upale. Osim toga, moguće je da BoNT/A djeluje izravno na upalne stanice, što je potkrijepljeno *in vitro* nalazima gdje je BoNT/A smanjio degranulaciju mastocita.(80) Djelovanje na ektravazaciju nakon središnje primjene je u skladu s našim prijašnjim nalazima o centralno posredovanom učinku na ektravazaciju. BoNT/A primijenjen intratekalno bi mogao izravno djelovati na aktivnost senzornih neurona koji luče tvar P i CGRP. Međutim, zasad nije jasno zbog čega periferno primijenjen BoNT/A također nije smanjio intenzitet ektravazacije, jer bi kod takvog davanja BoNT/A trebao djelovati i periferno i središnje. Također, nije jasno zbog čega nijednim načinom primjene nije bio značajno smanjen odgovor životinja na pritisak koljena PAM uređajem. Teoretski, moguće je da su doze BoNT/A bile preniske za izazivanje analgetskog odgovora, ili je iz nekog razloga BoNT/A ne djeluje na mehanički prag podražaja kod intenzivne boli izazvane s CFA. Nadalje, u dosadašnjim istraživanjima protuupalnih učinaka BoNT/A u koljenu pokazana je njegova učinkovitost na kroničnim modelima eksperimentalnog artritisa, te

kod kroničnog artritisa kod pasa i ljudi dok je u našem istraživanju učinak BoNT/A ispitan za vrijeme akutne upale.(2,3,5,36) Rezultati našeg eksperimenta ukazuju na kompleksniji mehanizam djelovanja BoNT/A, neovisan o analgetskom učinku, za koji je potrebno utvrđivanje molekularne podloge.

Zaključno, botulinum toksin, nekad smatran isključivo otrovom sa smrtnim posljedicama, postao je terapijska indikacija za brojne spastične poremećaje, tijekom vremena je prepoznata njegova uloga u ublažavanju simptoma migrene što je dovelo do istraživanja protuupalnih i analgetskih svojstava BoNT/A. Nakon provedbe kliničkih istraživanja, BoNT/A bi mogao postati prospektivna opcija za liječenje raznih oblika neuropatske boli te neurogene i imunogene upale.

7 Zahvale

Veliko hvala mojemu mentoru, dr.sc. Ivici Mataku, koji me je strpljivo i neumorno vodio kroz praktični dio ovoga istraživanja, tijekom izlaganja postera istoga eksperimenta te, konačno, za pomoć pruženu tijekom pisanja i izrade ovoga diplomskoga rada. Htio bih zahvaliti Ani Dugonjić Okroši za pomoć tijekom provođenja eksperimenta, te prof.dr.sc Zdravku Lackoviću koji mi je u svojem laboratoriju omogućio upustiti se u znanstveno istraživanje.

Također, zahvalio bih onima koji mi podršku daju kroz cijeli život, privatni i akademski, roditeljima, dvjema sestrama, te djevojci Matei Kirchbauer.

8 Bibliografija

1. Zakhari JS, Kinoyama I, Hixon MS, Di Mola A, Globisch D, Janda KD. Formulating a new basis for the treatment against botulinum neurotoxin intoxication: 3,4-Diaminopyridine prodrug design and characterization. *Bioorganic Med Chem.* 2011;
2. Hadley HS, Wheeler JL, Petersen SW. Effects of intra-articular botulinum toxin type A (Botox®) in dogs with chronic osteoarthritis: A pilot study. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2010;
3. Heikkilä HM, Hielm-Björkman AK, Morelius M, Larsen S, Honkavaara J, Innes JF, et al. Intra-articular botulinum toxin A for the treatment of osteoarthritic joint pain in dogs: A randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *Vet J.* 2014;
4. Cinone N, Letizia S, Santoro L, Gravina M, Amoroso L, Molteni F, et al. Intra-articular injection of botulinum toxin type A for shoulder pain in glenohumeral osteoarthritis: A case series summary and review of the literature. *J Pain Res.* 2018;
5. Hsieh LF, Wu CW, Chou CC, Yang SW, Wu SH, Lin YJ, et al. Effects of Botulinum Toxin Landmark-Guided Intra-articular Injection in Subjects With Knee Osteoarthritis. *PM R.* 2016;
6. Drinovac Vlah V, Filipović B, Bach-Rojecky L, Lacković Z. Role of central versus peripheral opioid system in antinociceptive and anti-inflammatory effect of botulinum toxin type A in trigeminal region. *Eur J Pain (United Kingdom).* 2018;
7. Ambrin G, Kumar R, Singh BR. Differential endopeptidase activity of different forms of type A botulinum neurotoxin: A unique relationship between the size of the substrate and activity of the enzyme. *Toxicon.* 2018;
8. Behrendorf-Nicol HA, Wild E, Bonifas U, Klimek J, Hanschmann KM, Krämer B, et al. In vitro potency determination of botulinum neurotoxin serotype A based on its receptor-binding and proteolytic characteristics. *Toxicol Vitro.* 2018;
9. Antonijevic B, Madle-Samardzija N, Turkulov V, Canak G, Gavrancic C, Petrovic-Milosevic I. Zoonoses: A current issue in contemporary infectology. *Med Pregl.* 2008;

10. Ali FR, Al-Niaimi F. Justinus Kerner and sausage poisoning: the birth of botulinum toxin. *Int J Dermatol*. 2016;
11. Kowal L, Wong E, Yahalom C. Botulinum toxin in the treatment of strabismus. A review of its use and effects. *Disability and Rehabilitation*. 2007.
12. Telarovic S, Mijatovic D, Telarovic I. Effects of various factors on sleep disorders and quality of life in Parkinson's disease. *Acta Neurol Belg*. 2015;
13. Akbari MR, Ameri A, Keshtkar Jaafari AR, Mirmohammadsadeghi A. Botulinum toxin injection for restrictive myopathy of thyroid-associated orbitopathy: Success rate and predictive factors. *J AAPOS*. 2016;
14. Sterling JL, Schey R, Malik Z. The Role of Botulinum Toxin Injections for Esophageal Motility Disorders. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2018;
15. Schnider P, Moraru E, Kittler H, Binder M, Kranz G, Voller B, et al. Treatment of focal hyperhidrosis with botulinum toxin type A: Long-term follow-up in 61 patients. *Br J Dermatol*. 2001;
16. Kaviani A, Khavari R. Disease-Specific Outcomes of Botulinum Toxin Injections for Neurogenic Detrusor Overactivity. *Urologic Clinics of North America*. 2017.
17. Fagien S, Carruthers JDA. A comprehensive review of patient-reported satisfaction with botulinum toxin type a for aesthetic procedures. *Plast Reconstr Surg*. 2008;
18. Garcia Ruiz PJ, Martínez Castrillo JC, Burguera JA, Campos V, Castro A, Cancho E, et al. Evolution of dose and response to botulinum toxin A in cervical dystonia: A multicenter study. *Journal of Neurology*. 2011.
19. Park J, Lee MS, Harrison AR. Profile of Xeomin(registered trademark)(incobotulinumtoxina) for the treatment of blepharospasm. *Clin Ophthalmol*. 2011;
20. Seo HG, Paik NJ, Lee SU, Oh BM, Chun MH, Kwon BS, et al. Neuronox versus BOTOX in the treatment of post-stroke upper limb spasticity: A multicenter randomized controlled trial. *PLoS One*. 2015;

21. Baumann L, Black L, Carruthers A, Carruthers J. Botulinum toxin type B (Myobloc). *Dermatologic Surgery*. 2003.
22. Baricich A, Grana E, Carda S, Santamato A, Cisari C, Invernizzi M. High doses of onabotulinumtoxinA in post-stroke spasticity: a retrospective analysis. *J Neural Transm*. 2015;
23. Cardoso F. Botulinum toxin in parkinsonism: The when, how, and which for botulinum toxin injections. *Toxicon*. 2018;
24. Patil S, Willett O, Thompkins T, Hermann R, Ramanathan S, Cornett EM, et al. Botulinum Toxin: Pharmacology and Therapeutic Roles in Pain States. *Current Pain and Headache Reports*. 2016.
25. Naumann M, Jankovic J. Safety of botulinum toxin type A: a systematic review and meta-analysis. *Curr Med Res Opin*. 2004;
26. Bach-Rojecky L, Lacković Z. Antinociceptive effect of botulinum toxin type a in rat model of carrageenan and capsaicin induced pain. *Croat Med J*. 2005;
27. Gabay E, Wolf G, Shavit Y, Yirmiya R, Tal M. Chronic blockade of interleukin-1 (IL-1) prevents and attenuates neuropathic pain behavior and spontaneous ectopic neuronal activity following nerve injury. *Eur J Pain*. 2011;
28. Matak I, Lacković Z. Botulinum toxin A, brain and pain. *Progress in Neurobiology*. 2014.
29. Jensen TS, Finnerup NB. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: Clinical manifestations and mechanisms. *The Lancet Neurology*. 2014.
30. Pethő G, Reeh PW. Sensory and Signaling Mechanisms of Bradykinin, Eicosanoids, Platelet-Activating Factor, and Nitric Oxide in Peripheral Nociceptors. *Physiol Rev*. 2012;
31. Sato S. The histopathological studies of the experimental rhinosinuitis. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho*. 1963;
32. Lolignier S, Eijkelkamp N, Wood JN. Mechanical allodynia. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. 2014.
33. Kim YH, Back SK, Davies AJ, Jeong H, Jo HJ, Chung G, et al. TRPV1 in GABAergic

- Interneurons Mediates Neuropathic Mechanical Allodynia and Disinhibition of the Nociceptive Circuitry in the Spinal Cord. *Neuron*. 2012;
34. Dodick DW, Turkel CC, Degryse RE, Aurora SK, Silberstein SD, Lipton RB, et al. OnabotulinumtoxinA for treatment of chronic migraine: Pooled results from the double-blind, randomized, placebo-controlled phases of the PREEMPT clinical program. *Headache*. 2010;
 35. Do TP, Hvedstrup J, Schytz HW. Botulinum toxin: A review of the mode of action in migraine. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2018.
 36. Chou CL, Lee SH, Lu SY, Tsai KL, Ho CY, Lai HC. Therapeutic effects of intra-articular botulinum neurotoxin in advanced knee osteoarthritis. *J Chinese Med Assoc*. 2010;
 37. Wu T, Song HX, Dong Y, Ye Y, Li JH. Intra-articular injections of botulinum toxin a for refractory joint pain: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Rehabilitation*. 2017.
 38. Wu H, Sultana R, Taylor KB, Szabo A. A prospective randomized double-blinded pilot study to examine the effect of botulinum toxin type a injection versus lidocaine/depomedrol injection on residual and phantom limb pain: Initial report. *Clin J Pain*. 2012;
 39. Mittal SO, Safarpour D, Jabbari B. Botulinum Toxin Treatment of Neuropathic Pain. *Semin Neurol*. 2016;
 40. Yaksh TL. Neurobiological basis for the use of botulinum toxin in pain therapy. *Toxicon*. 2013;
 41. da Silva LB, Poulsen JN, Arendt-Nielsen L, Gazerani P. Botulinum neurotoxin type A modulates vesicular release of glutamate from satellite glial cells. *J Cell Mol Med*. 2015;
 42. Meng J, Wang J, Lawrence G, Dolly JO. Synaptobrevin I mediates exocytosis of CGRP from sensory neurons and inhibition by botulinum toxins reflects their anti-nociceptive potential. *J Cell Sci*. 2007;
 43. Edvinsson J, Warfvinge K, Edvinsson L. Modulation of inflammatory mediators in the

- trigeminal ganglion by botulinum neurotoxin type A: an organ culture study. *J Headache Pain*. 2015;
44. Durham PL, Cady R, Cady R, Blumenfeld AJ. Regulation of Calcitonin Gene-Related Peptide Secretion from Trigeminal Nerve Cells by Botulinum Toxin Type A: Implications for Migraine Therapy. *Headache*. 2004;
 45. Dolly JO, O'Connell MA. Neurotherapeutics to inhibit exocytosis from sensory neurons for the control of chronic pain. *Current Opinion in Pharmacology*. 2012.
 46. Park J, Park HJ. Botulinum Toxin for the Treatment of Neuropathic Pain. *Toxins (Basel)*. 2017;
 47. Matak I, Rossetto O, Lacković Z. Botulinum toxin type A selectivity for certain types of pain is associated with capsaicin-sensitive neurons. *Pain*. 2014;
 48. Marino MJ, Terashima T, Steinauer JJ, Eddinger KA, Yaksh TL, Xu Q. Botulinum toxin B in the sensory afferent: Transmitter release, spinal activation, and pain behavior. *Pain*. 2014;
 49. Aoki KR. Review of a proposed mechanism for the antinociceptive action of botulinum toxin type A. In: *NeuroToxicology*. 2005.
 50. Cui M, Khanijou S, Rubino J, Aoki KR. Subcutaneous administration of botulinum toxin a reduces formalin-induced pain. *Pain*. 2004;
 51. Richardson JD. Cellular Mechanisms of Neurogenic Inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;
 52. Olah Z, Szabo T, Karai L, Hough C, Fields RD, Caudle RM, et al. Ligand-induced Dynamic Membrane Changes and Cell Deletion Conferred by Vanilloid Receptor 1. *J Biol Chem*. 2001;
 53. Belvisi MG. Sensory nerves and airway inflammation: Role of A δ and C-fibres. *Pulm Pharmacol Ther*. 2003;
 54. Pinho-Ribeiro FA, Baddal B, Haarsma R, O'Seaghdha M, Yang NJ, Blake KJ, et al. Blocking Neuronal Signaling to Immune Cells Treats Streptococcal Invasive Infection.

- Cell. 2018;
55. Fan C, Chu X, Wang L, Shi H, Li T. Botulinum toxin type A reduces TRPV1 expression in the dorsal root ganglion in rats with adjuvant-arthritis pain. *Toxicon*. 2017;
 56. Intiso D, Basciani M, Santamato A, Intiso M, Di Rienzo F. Botulinum toxin type a for the treatment of neuropathic pain in neuro-rehabilitation. *Toxins*. 2015.
 57. Bach-Rojecky L, Dominis M, Lacković Z. Lack of anti-inflammatory effect of botulinum toxin type A in experimental models of inflammation. *Fundam Clin Pharmacol*. 2008;
 58. Bach-Rojecky L, Lacković Z. Central origin of the antinociceptive action of botulinum toxin type A. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009;
 59. Bach-Rojecky L, Šalković-Petrišić M, Lacković Z. Botulinum toxin type A reduces pain supersensitivity in experimental diabetic neuropathy: Bilateral effect after unilateral injection. *Eur J Pharmacol*. 2010;
 60. Filipović B, Matak I, Bach-Rojecky L, Lacković Z. Central action of peripherally applied botulinum toxin type a on pain and dural protein extravasation in rat model of trigeminal neuropathy. *PLoS One*. 2012;
 61. Lackovic Z, Filipovic B, Matak I, Helyes Z. Activity of botulinum toxin type A in cranial dura: Implications for treatment of migraine and other headaches. *Br J Pharmacol*. 2016;
 62. Russell WMS, Burch RL. The Principles of Humane Experimental Technique. In: *The Principles of Humane Experimental Technique*. 1959.
 63. Zimmermann M. Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1986;
 64. Simonian MH. Spectrophotometric Determination Of Protein Concentration. In: *Handbook of Food Analytical Chemistry*. 2005.
 65. Barton NJ, Strickland IT, Bond SM, Brash HM, Bate ST, Wilson AW, et al. Pressure application measurement (PAM): A novel behavioural technique for measuring hypersensitivity in a rat model of joint pain. *J Neurosci Methods*. 2007;
 66. Leuchtweis J, Imhof A-K, Montechiaro F, Schaible H-G, Boettger MK. Validation of the

- digital pressure application measurement (PAM) device for detection of primary mechanical hyperalgesia in rat and mouse antigen-induced knee joint arthritis. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2010;
67. McCarson KE. Models of Inflammation: Carrageenan- or Complete Freund's Adjuvant (CFA)-Induced Edema and Hypersensitivity in the Rat. *Curr Protoc Pharmacol*. 2015 Sep;70:5.4.1-9.
 68. Drinovac Vlah V, Bach-Rojecky L, Lacković Z. Antinociceptive action of botulinum toxin type A in carrageenan-induced mirror pain. *J Neural Transm*. 2016;
 69. Morales-Medina JC, Griffiths NH, Flores G, Mastranzo VM, Iannitti T. Cerebrolysin reduces mechanical allodynia in a rodent model of peripheral inflammation. *Neurosci Lett*. 2017;
 70. Mangione AS, Obara I, Maiarú M, Geranton SM, Tassorelli C, Ferrari E, et al. Nonparalytic botulinum molecules for the control of pain. *Pain*. 2016;
 71. Fontes JA, Barin JG, Talor M V., Stickel N, Schaub J, Rose NR, et al. Complete Freund's adjuvant induces experimental autoimmune myocarditis by enhancing IL-6 production during initiation of the immune response. *Immun Inflamm Dis*. 2017;
 72. Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunology and Cell Biology*. 2004.
 73. Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol*. 2001;
 74. Yoo KY, Lee HS, Cho YK, Lim YS, Kim YS, Koo JH, et al. Anti-inflammatory effects of botulinum toxin type a in a complete Freund's adjuvant-induced arthritic knee joint of hind leg on rat model. *Neurotox Res*. 2014;
 75. Favre-Guilmarc C, Auguet M, Chabrier PE. Different antinociceptive effects of botulinum toxin type A in inflammatory and peripheral polyneuropathic rat models. *Eur J Pharmacol*. 2009;
 76. Scallan J, Huxley V, Korthuis R. Pathophysiology of Edema Formation. *Capill Fluid Exch*

- Regul Funct Pathol. 2010;
77. Bellinger DL, Lorton D. Autonomic regulation of cellular immune function. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. 2014.
 78. Duan L, Chen J, Razavi M, Wei Y, Tao Y, Rao X, et al. Alpha2B-Adrenergic Receptor Regulates Neutrophil Recruitment in MSU-Induced Peritoneal Inflammation. *Front Immunol*. 2019;10:501.
 79. Zheng Z, Liu Y, Zhu L, Tang J, Huang W, Cheng B. Lumbar sympathectomy reduces vascular permeability, possibly through decreased adenosine receptor A2a expression in the hind plantar skin of rats. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2018;
 80. Choi JE, Werbel T, Wang Z, Wu CC, Yaksh TL, Di Nardo A. Botulinum toxin blocks mast cells and prevents rosacea like inflammation. *J Dermatol Sci*. 2019;

9 Životopis

OSOBNJE INFORMACIJE

Ime i prezime: Mario Špoljarić

Datum rođenja: 25.04.1994.

Adresa: Bošnjaci 163, 32281 Ivankovo

Broj telefona: +385 991949302

Adresa elektroničke pošte: mariospoljaric@hotmail.com

OBRAZOVANJE I USPJEH U DOSADAŠNJEM FAKULTETSKOM OBRAZOVANJU

2001-2009 Osnovna škola August Cesarec Ivankovo

2009-2013 Srednja škola Gimnazija Matija Antun Reljković Vinkovci

2013-2019 Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet

Osvojeni ECTS bodovi: 352.0

Prosjek ocjena: 4.436

DODATNE AKTIVNOSTI:

Demonstrator na Katedri za fiziologiju i imunologiju četiri ak. godine (2015-2019)

Član Studentske sekcije za infektologiju od 2018

Sudjelovanje u „Natjecanje u kliničkim vještinama“ 2017. i 2018. godine (1. i 3. ekipno mjesto)

Izlaganje znanstvenog postera na Projektu popularizacije farmakologije

Sudjelovanje na kongresima CROSS 14 i CROSS 15